ÜBER DIE ELEKTRONISCHE ZÄHLUNG DER ZELLEN IN MILCH MIT DEM COULTER COUNTER "MODELL F"

Klaus Brunold

1972

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546027_0016

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. W. Baier

Arbeit unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

Über die elektronische Zählung der Zellen in Milch mit dem Coulter Counter "Modell F"

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Klaus Brunold

aus

Amberg

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Prof. Dr. J. Boessneck
Referent:	Prof. Dr. K. Walser
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. W. Gedek

Tag der Promotion: 14. Juli 1972

DISSERTATIONS – und FOTODRUCK FRANK oHG
8000 München 2 · Gabelsbergerstr. 15 · Tel.: 2 80 90 90

Inhaltsverzeichnis

		Seite
A	Einleitung	1
B	Literatur	2
	a) Prinzip der elektronischen Partikelzählung	2
	b) Die elektronische Zählung von Zellen in Rohmilch	3
	c) Präparation und Untersuchungstechnik	7
	d) Geräte und Glaswaren	7
	e) Probenentnahme	8
	f) Stabilisierung der Milchproben	8
	g) Präparation des Elektrolyt-Emulgator-Gemisches	9
	h) Auflösung der Fettpartikel	10
	i) Elektronische Auszählung	11
	k) Sicherheit der Methodik	12
C	Eigene Untersuchungen	13
	a) Material und Methodik	13
	b) Ergebnisse	16
D	Diskussion	23
E	Zusammenfassung	29
F	Summary	30
G	Literaturverzeichnis	31
H	Tabellenanhang	33

A EINLEITUNG

Seit längerer Zeit werden an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik elektronische Partikelzählungen mit dem Coulter Counter "Modell F" der Firma Coulter Electronics Ltd. durchgeführt. Mit diesem Gerät wurden Leukozyten- und Erythrozytenzählungen im Blut mit guten Ergebnissen vorgenommen. Auch die Zählung von Zellen in Milch wird seit einigen Jahren durchgeführt. Bei mehreren Tausenden von Milchproben konnte jedoch nie die in der Literatur angegebene Genauigkeit und Übereinstimmung der elektronisch ermittelten Zählergebnisse mit mikroskopisch erhaltenen Ergebnissen festgestellt werden.

Dies war der Anlaß für weitere systematische Versuchsanstellungen zur Überprüfung der Genauigkeit des Coulter Counters "Modell F" und der Vergleichsmöglichkeit mit der mikroskopischen Methode nach PRESCOTT und BREED.

B LITERATUR

a) Prinzip der elektronischen Partikelzählung

Der Coulter Counter "Modell F" gestattet die Zählung von Teilchen, die in einer Elektrolytlösung dispergiert werden. Diese Partikel werden mittels Unterdruck aus einer angeschlossenen Vakuum-Pumpe durch eine geeichte Kapillaröffnung, die ihrerseits wiederum zwischen zwei Elektroden liegt, gesogen. Diese durchgesaugte Suspensionsmenge wird mittels eines Quecksilbermanometers ständig gleichgehalten. Fließen beim Betrieb des Gerätes einzelne Partikel durch diese Kapillaröffnung, die eine ~~sich~~ in einem Stromkreis liegende Meßzone darstellt, so ändert sich der Widerstand, der zwischen beiden Elektroden herrscht. Diese Widerstandsänderung wird von der Meßzone als elektrischer Impuls wahrgenommen, der dem Volumen der jeweiligen Teilchen proportional ist. Die so ermittelten Impulse werden danach zunächst verstärkt und dann sowohl auf einem Oszillographen sichtbar gemacht, als auch mit Zählröhren anzahlmäßig festgehalten.

Alle Impulse, die unterhalb einer bestimmten, durch die Schwellenwerteinstellung (THRESHOLD) selbstgewählten Impulshöhe liegen, werden durch einen Diskriminator abgehalten. Erfolgen bei steigendem "Threshold" mehrere Zählungen, so kann man eine Häufigkeitsverteilungskurve der Suspensionspartikel anfertigen.

Darüber hinaus wurde dem Gerät noch eine akustische Kontrolleinrichtung in Form eines kleinen Lautsprechers eingebaut. Bei jedem gezählten Tausender gibt dieser einen Knackton wieder, woraus das Bedienungspersonal den regelmäßigen Ablauf des Zählvorgangs auch hören kann.

Zusätzlich zu den oben genannten Einrichtungen für die Zählung ist ein Bildschirm eingebaut, auf dem jederzeit sichtbar die Kapillaröffnung dargestellt wird. Dadurch kann ständig die Sauberkeit der Ansaugöffnung kontrolliert werden.

Der ganze Zählvorgang besteht dann nur noch darin, daß man, nachdem der Behälter mit Elektrolyt auf die Becherstandplatte gestellt wurde, zunächst den Haupthahn öffnet.

In wenigen Sekunden nullt sich das Zählwerk selbsttätig, die Projektionsbeleuchtung wird heller. Auf dem Bildschirm kontrolliert man die Kapillaröffnung. Danach schließt man den Haupthahn. Wird die Projektionsbeleuchtung wieder dunkler, ist der Zählvorgang abgeschlossen.

b) Die elektronische Zählung von Zellen in Rohmilch

Für die elektronische Zellzählung war es zunächst wichtig, die Milch so zu präparieren, daß die Zellen als einzelne Partikel einer bestimmten Größe in der zu untersuchenden Suspension vorliegen. Die Milch enthält in einem ml ca. 2 bis 8 Milliarden Fettkügelchen mit einem Durchmesser von 1 bis 15 μ , mithin einer Größe, die mit der der Zellen zum Teil übereinstimmt (TOLLE).

TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN entwickelten 1966 ein Verfahren, mit dem die Milch mittels chemischer Substanzen so präpariert wird, daß die Fettkügelchen bei der Zählung nicht mehr störend auftreten. Sie verwendeten hierfür ein Netzmittel aus der Gruppe der Alkylphenolpolyglykoläther.

Andere Untersucher, nämlich CULLEN (1965) sowie PHIPPS und NEWBOULD (1966 bzw. 1967) versuchten die störenden Fettkügelchen mit physikalischen Mitteln aus der Nativmilch zu entfernen. Sie zentrifugierten die Milch in siliconierten

Spezialröhrchen, entfernten die gewonnene Fettschicht und resuspendierten das übrig gebliebene Sediment in physiologischer Kochsalzlösung.

Auch READ, REYES, BRADSHAW und PEELER beschrieben 1967 eine Präparationsmethode, die auf dem gleichen Prinzip beruht.

DIJKMAN, SCHIPPER und WALSTRA verglichen 1966 beide Methoden und kamen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß die Methode nach TOLLE und Mitarbeitern der von PHIPPS und NEWBOULD wegen ihrer leichteren Durchführbarkeit vorzuziehen sei.

Diese Erfahrungen wurden 1968 von DIJKMAN nach vergleichenden Zählungen nach der Methode von PRESCOTT und BREED mit der elektronischen Zellzählung nochmals bestätigt.

Auch TERPLAN und SCHLEYERBACH schreiben 1967, daß die von TOLLE und Mitarbeitern empfohlene Verwendung von Emulgatoren nach vorheriger Fixierung der Zellen in ein nahezu praxisreifes Stadium getreten sei. Diese Art der Milchprobenvorbereitung sei der Zählung aus dem resuspendierten Sediment (CULLEN 1965, 1967) wegen der einfacheren Durchführbarkeit vorzuziehen. Die Härtung der Milchzellen bedürfe jedoch eines zu großen Zeitaufwandes.

Da die Fixierung ein unerläßlicher Vorgang ist, eine Verkürzung der Fixierungsdauer nur mit Formalin sich aber als ungenügend erwies, haben die beiden oben genannten Autoren andere Fixierungsmethoden im Hinblick auf eine schnellere Härtung überprüft. So wurde zunächst die Fixierung mit Formalin im Vakuum versucht, später wurde dann als Fixierungsmittel Glutaraldehyd allein und in Verbindung mit Formalin angewandt. TERPLAN und SCHLEYERBACH kamen in ihren Untersuchungen zu der Ansicht, daß durch eine Härtung im Vakuum zwar eine Verkürzung erzielt werden konnte, diese sich jedoch der Härtung mit Glutaraldehyd als unterlegen erwies.

Mit Glutaraldehyd lassen sich die Zellen schon innerhalb von 2 Stunden so ausreichend fixieren, daß die Zählergebnisse mit denen der über 24 Stunden mit Formalin fixierten Proben gut übereinstimmen. Jedoch sind die Autoren der Ansicht, daß diese Methode der Fixierung eine Aufbewahrung der Proben über mehr als 4 Stunden nicht zuläßt. Ist eine längere Aufbewahrung nötig, so bietet sich die Verwendung eines Fixierungsgemisches aus Formalin und Glutaraldehyd an. Mit diesem Gemisch wurden auch nach längerer Aufbewahrungszeit noch gute Ergebnisse erzielt.

Auch DIJKMAN versuchte 1968 die Fixierungsdauer zu verkürzen, und zwar geschah dies bei seinen Versuchen durch Erhitzen der Proben auf 55° C über eine verschiedene Zeitdauer. Wie man aus der nachfolgenden Tabelle von DIJKMAN erkennen kann, wurde die beste Übereinstimmung mit der mikroskopischen Zellzählung nach Erhitzen über eine Stunde bei 55° C Fixierung erreicht.

Tabelle 1

Probe	A	B	C	D
sofort	198 600	186 000		
nach 1/2 Std.	680 600	486 400	1 158 900	794 800
nach 1 Std.	701 100	522 100	1 208 900	807 700
nach 2 Std.	767 700	584 000	1 357 500	848 000
nach 3 Std.	1 077 500	743 700	1 417 500	876 800
mikroskop. Zählung	736 000	480 000	1 230 000	809 000

An über 100 000 Zellzahlbestimmungen wurde die Genauigkeit der Methode der elektronischen Zellzählung nach chemischer Fixierung im Rindergesundheitsdienst in Bayern von KLEINSCHROTH, RICHTER und SCHUMANN im Jahre 1968 überprüft. Sie haben die Präzision der Methodik bestätigt, die Korrelation zur mikroskopischen Auszählung nach PRESCOTT und BREED (1910) wurde

von diesen Autoren mit r = + 0,97 errechnet.

Auch KLEIN und THOMAS (1968) halten nach Zählungen von fast 10 000 Milchproben die elektronische Zellzählung nach chemischer Vorbehandlung der Milch für eine elegante Methode, Zellzahlbefunde in der Milch zu objektivieren.

1968 hat noch einmal PHIPPS die von ihm und NEWBOULD entwickelte Zentrifugiermethode mit der von TOLLE und Mitarbeitern entwickelten Methode verglichen und dabei gefunden, daß bei letzterer gute Ergebnisse erzielt wurden. Zudem seien die Einfachheit der Ausrüstung und Technik der chemischen Präparation ein entscheidender Vorteil.

Als Emulgator wird Oktylphenoldekaaethylenaether, das unter dem Handelsnamen TRITON X 100 bekannt ist, verwendet (TOLLE). Jedoch auch andere Emulgatoren, wie WITOPAL und der in der DDR hergestellte DISPERGATOR BO sind nach vergleichenden Untersuchungen von HAUKE (1968) ebenso zur Auflösung des Milchfettes geeignet.

Übereinstimmend haben alle hier genannten Autoren zugegeben, daß mitunter stark erhöhte Zählwerte auftreten können. Diese "Ausrutscher" wurden zum Teil einer ungenügenden fettlösenden Wirkung des Emulgators, zum Teil einer von KLEINSCHROTH und Mitarbeitern festgestellten Benetzung des oberen Glasrandes mit Milchtropfen beim Pipettieren zugeschrieben. Andere Untersucher wiederum erhielten sehr hohe Werte bei Milchproben von mehr als 6 % Fettanteil, wie auch Änderungen der Netzspannung als Fehlerquelle genannt wurden (DIJKMAN).

c) Präparation und Untersuchungstechnik

Die im folgenden angeführte Präparation und Untersuchungstechnik der Milchproben wurde von TOLLE, ZEIDLER, HEESCHEN, KRAACK und REICHMUTH entwickelt und zur Praxisreife gebracht. Sie wurde 1968 in den Kieler Milchwirtschaftlichen Forschungsberichten veröffentlicht. Sie hat bis heute ihre Gültigkeit und wurde auch von allen anderen Autoren, zum Teil mit ganz geringen Veränderungen (KLEINSCHROTH), übernommen. Im September 1971 wurde diese Anleitung nochmals von TOLLE im Anhang I der "GRUNDLAGEN FÜR EINE SYSTEMATISCHE MASTITIS-BEKÄMPFUNG" aus dem Institut für Milchhygiene der Bundesanstalt für Milchforschung als Arbeitsanleitung für eine Vorbereitung von Nativmilch zur elektronischen Zellzählung mit dem Gerät "COULTER COUNTER" dargelegt.

d) Geräte und Glaswaren

An Geräten werden benötigt:

1. Ein Coulter Counter, Modell A, F oder FN,
2. ein Wasserbad mit einem Temperaturbereich bis 100° C und einer Fehlergrenze von ± 0,5° C,
3. ein Membranfilter mit einer mittleren Porenweite von $< 1\ \mu$,
4. Pipetten und Pipettiergeräte,
5. Spül- und Sterilisationseinrichtungen.

Glaswaren

Die Glaswaren müssen aus gut durchsichtigem, farblosem Glas sein. Die Röhrchen, in denen die zu untersuchenden Milchproben präpariert werden sollen, müssen ca. 100 mm hoch sein, einen Innendurchmesser von ca. 14 mm, einen Außendurchmesser von ca. 16 mm, runden Boden und geraden Rand haben. Sie werden mit dazu passenden Gummi- oder hitzesterilisierbaren Silicon-Stopfen, die einwandfrei abdichten, verschlossen.

Die Sterilisation der Glaswaren erfolgt im Autoklaven feucht mindestens 15 Minuten bei 120° C oder im Heißluftsterilisator bei 180° C ca. 1 Stunde.

e) Probenentnahme

Die Proben zur elektronischen Zellzählung können aus dem Anfangsgemelk oder dem Gesamtgemelk von Eutervierteln, Kühen und Beständen entnommen werden, die Menge beträgt 10 ml. Die Entnahme geschieht entweder mit einer Pipette oder nach KLEINSCHROTH mit einem 10 ml fassenden Stechheber aus Tank, Kanne oder Probeglas. Die zu untersuchende Milch wird vor der Probeentnahme kräftig durchmischt. KLEINSCHROTH entnahm diese Proben aus der Anlieferungsmilch von 22 850 Beständen aus der Milchwaage der Molkereien.

Kolostrum, Altgemelksekret und Milchen mit über 5 Millionen Keimen pro ml sind zur Probenentnahme nicht geeignet (TOLLE).

f) Stabilisierung der Milchproben

Zur Stabilisierung der Proben wird eine partikelfrei filtrierte Stabilisierungsflüssigkeit mit folgender Zusammensetzung benötigt:

10 ml Formaldehyd sol. 35 %
0,02 g Eosin wasserlöslich
Aqua. dest. ad 100 ml

Diese Flüssigkeit dient der Fixation der Milchzellen und zur Verhinderung der Keimvermehrung.

Von dieser Stabilisierungsflüssigkeit werden 0,2 ml mittels einer 1 ml-Cornwallspritze in die Proberöhrchen gegeben. Darauf füllt man ca. 10 ml der zu untersuchenden Milch,

verschließt die Röhrchen mit einem Gummi- oder Siliconstopfen und durchmischt das Ganze zur gleichmäßigen Verteilung der Stabilisierungsflüssigkeit. Am besten geschieht dies durch mehrmaliges Schwenken der Proberöhrchen. Danach müssen die Proberöhrchen zur vollständigen Fixation 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehenbleiben. Eine Schnellfixation ist, wie bereits vorher angegeben, möglich. Nach der Fixation können die Proben maximal 72 Stunden bis zur Weiterverarbeitung im Kühlschrank gelagert werden.

g) Präparation des Elektrolyt-Emulgator-Gemisches

Dieses Gemisch setzt sich zusammen aus:

1.) 84,5 Vol % phys. NaCl
2.) 1,0 Vol % Formaldehyd sol.
3.) 12,5 Vol % Äthanol
4.) 2,0 Vol % Triton X 100

Die 4 Bestandteile werden folgendermaßen angesetzt: Zuerst gibt man zu der erforderlichen Menge physiologischer Kochsalzlösung die angegebene Menge Formaldehyd sol. und im Anschluß daran Äthanol. Zuletzt wird diesem Gemisch das Triton X 100 zugegeben. Dabei ist darauf zu achten, daß nichts von dem Triton X 100 in der Pipette zurückbleibt, da dieses Reagenz sehr zähflüssig ist. Danach wird das Gemisch mit einer entsprechenden Menge einer 1-molaren Trispufferlösung (Trishydroximethylaminomethan) auf den gewünschten pH von 7,0 gebracht. Das gesamte Elektrolyt-Emulgator-Gemisch wird dann durch einen Membranfilter, dessen mittlere Porenweite unter 0,45 μ liegen sollte, partikelfrei filtriert. In gut präparierten Elektrolyten sollten sich nicht mehr als 100 Partikel pro ml befinden.

Werden die Glasgefäße, in denen sich das Gemisch befindet, mit Siliconstopfen gut verschlossen, so kann dieses einige Wochen vorrätig gehalten werden.

h) Auflösung der Fettpartikel

Vor der weiteren Verdünnung wird die stabilisierte Milchprobe kräftig durchmischt, dann erfolgt die Verdünnung mit dem Elektrolyt-Emulgator-Gemisch im Verhältnis 1 : 100 im Proberöhrchen. Dabei geht man folgendermaßen vor:

Mit einer MARBURG-Pipette werden 0,1 ml der Milchprobe in ein Reagenzglas gegeben, dazu fügt man mit einer automatischen Pipettierspritze 9,9 ml Emulgator-Gemisch, wobei gleichzeitig eine gute Durchmischung erfolgt.

KLEINSCHROTH empfiehlt beim Pipettieren mit der MARBURG-Pipette die Verwendung einer Randabdeckplatte für Reagenzgläser zur Sicherung und Erleichterung des Pipettiervorganges.

Anschließend erfolgt die Inkubation der Proben 10 Minuten (KLEINSCHROTH - 15 Minuten) bei 80° C (± 1° C) in einem Wasserbad mit elektronischer Temperatureinstellung und Umwälzpumpe. Während dieser 10 Minuten erfolgt die Auflösung der Fettpartikel. Optisch erkennt man dies daran, daß die vorher trüben Proben jetzt klar sind. Ein leichter opaleszierender Schimmer stammt von den durch Formalin gehärteten Kaseinmizellen, die jedoch die Zählung nicht beeinträchtigen. Nach der Inkubation werden die Proben zur Zählung auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Diffuse Trübungen der Proben nach der Inkubation können durch grobsinnlich veränderte Mastitissekrete, durch stark verkeimte Milchproben und durch Proben von Milchen mit einem sehr hohen Fettgehalt hervorgerufen werden. Treten diese Trübungen jedoch häufiger auf, sollte die Technik der Probenentnahme und Präparation überprüft werden, da die vollständige Beseitigung der Fettkügelchen eine wichtige Voraussetzung für eine exakte Messung ist.

Zur Zählung werden die Zellsuspensionen in ein Zählgefäß mit einem Innendurchmesser von ca. 22 mm gegossen. Dieses Gläschen wird nach der Zählung ausgeleert, jedoch nicht zwischengespült, sondern gleich mit der nächsten Suspension gefüllt. Die Zählung muß innerhalb von 3 Stunden nach der Inkubation erfolgen.

i) Elektronische Auszählung

Die elektronische Auszählung erfolgt mit einem elektronischen Partikelzähler COULTER COUNTER Modell "A-med" oder "F", wobei dieser bei einem Meßvolumen von 0,1 ml bei einer Kapillare von 100 μ und einer Verdünnung von 1 : 100 den Zellgehalt pro ml in Tausend angibt.

Meßstrom und Verstärker am Gerät werden dann so eingestellt, daß bei ungestörter Basislinie die durch die Zellen hervorgerufenen Impulse etwa die Hälfte bis zwei Drittel des Oszillographenschirmes einnehmen. Dann wird durch eine Plateaubestimmung der optimale Schwellenwert ermittelt. Dafür eignen sich Proben mit hohem Zellgehalt von 2 bis 3 Millionen. Diese werden präpariert und mit ständig steigenden Schwellenwerteinstellungen gemessen, wobei man zweckmäßigerweise beim Schwellenwert 4 beginnt und nach jeder Messung um 4 Teilstriche erhöht. Die Meßwerte werden notiert und als Summenkurve aufgezeichnet. Bei niedrigen Schwellenwerten werden sehr hohe Zählergebnisse erreicht, weil dabei kleine Schmutzpartikel, Zelldetritus und andere Teilchen mitgezählt werden. Beim weiteren Zählvorgang ergeben sich dann bei steigendem Schwellenwert in einem bestimmten Bereich annähernd gleiche Impulszahlen. Dies zeigt sich im Kurvenbild an einem fast horizontal verlaufenden Teil der Kurve, der das sogenannte Plateau darstellt. In diesem Bereich werden neben den Zellen nur noch wenige Störpartikel erfaßt. Anschließend fällt die Kurve steil ab, d.h. mit steigendem Schwellenwert werden

zunehmend die Partikel mit größer werdendem Volumen ausgeblendet. Der optimale Schwellenwert liegt kurz vor dem deutlichen Abfall der Kurve. Diese Einstellung erfaßt selektiv die Zellen in der Milch.

Diese gefundene Geräteeinstellung gilt für die Untersuchung frisch ermolkener und sofort stabilisierter Viertel- und Einzelgemelksproben. Sie sollte regelmäßig überprüft werden. Um einen Vergleich der Zählergebnisse zwischen den Untersuchungsinstituten sicherzustellen empfiehlt TOLLE die Verwendung einer von ihm beschriebenen Leukozytensuspension (persönliche Mitteilung).

k) Sicherheit der Methodik

Nach TOLLE sollte bei Routinemessungen die durchschnittliche Standardabweichung zwischen zwei unabhängigen Ansätzen einer größeren Anzahl von Proben nicht mehr als 30 000 Zellen pro ml Milch betragen. Die Korrelation zu optischen Vergleichszählungen muß in der Größenordnung von r = + 0,97 liegen.

C EIGENE UNTERSUCHUNGEN

a) Material und Methodik

Für die in dieser Arbeit durchgeführten elektronischen Zellzählungen wurde das Modell "F" der Firma COULTER COUNTER ELECTRONIC LTD. verwendet. Dieses Gerät hat eine 0,1 ml Meßstrecke. Es zeigt somit bei einer Verdünnung der Milchproben von 1 : 100 die Zellzahl in 1 000 an. Der Schwellenwert wurde bei 23 ermittelt. Jede angesetzte Probe wurde zweimal elektronisch ausgezählt und als Endwert daraus der Mittelwert errechnet.

Die auszuzählenden Milchproben wurden nach den Empfehlungen von TOLLE, ZEIDLER, HEESCHEN, KRAACK und REICHMUTH (1968) für die Zählung präpariert. Als einzige Veränderung wurden sie anstatt 10 Minuten 15 Minuten im Wasserbad bei 80° C (nach KLEINSCHROTH) inkubiert.

Das Fixationsgemisch in Form der 10-%igen Formalin-Lösung mit Eosin-Zusatz wurde vorrätig gehalten, das Elektrolyt-Emulgator-Gemisch vor jeder Zählung neu angesetzt und zweimal partikelfrei filtriert.

Bei allen zur Untersuchung angelieferten Proben handelt es sich um Anfangsgemelke, die direkt vor dem Melken entnommen wurden. Die ersten Milchstrahlen wurden verworfen. Kolostrum und das Sekret altmelkender Tiere kurz vor dem Trockenstellen wurde nach den Empfehlungen von TOLLE nicht zur Zählung verwendet.

Die untersuchten Milchproben stammen zum größten Teil aus der schwarzbunten Herde des Lehr- und Versuchsgutes Schleißheim. Es handelt sich dabei um Einzelgemelke in

einer Menge von ca. 50 bis 60 ml, die in vorher gewaschenen und sterilisierten, mit Stopfen verschlossenen Glasgefäßen, unmittelbar nach der Entnahme in unsere Klinik gebracht und fixiert wurden. Weitere 100 Milchproben stammen je zur Hälfte aus zwei größeren Rinderbeständen (Höhenfleckvieh bzw. Deutsche Rotbunte).

Die Entnahme der Milchproben aus den Probegläsern erfolgte mit 10 ml Saugpipetten. Diese Proben wurden in die Probegläschen auf die mit einer 1-ml ULTRA-ASEPT-Dosierspritze vorgelegten 0,2 ml des Fixationsgemisches gegeben. Aus den fixierten Proben wurden nach 24 Stunden mit einer Mikroliter-Pipette MARBURG 0,1 ml Milch entnommen und mit einer ULTRA-MATIC 10-ml-Dosierspritze 10 ml des Elektrolyt-Emulgator-Gemisches dazugegeben.

Alle Proben wurden, wie bereits erwähnt, am selben Tag noch fixiert und meist gleichzeitig noch für die mikroskopische Zählung nach PRESCOTT und BREED ausgestrichen (0,01 ml je cm^2 und Probe). Konnte dieses Ausstreichen am selben Abend aus Zeitmangel nicht mehr erfolgen, so geschah dies sofort am nächsten Morgen. Das Ausstreichen, die Färbung und die Zählung der mikroskopischen Präparate wurden von einer erfahrenen Laborkraft durchgeführt.

Es wurden insgesamt 500 Einzelproben entnommen, die jeweils in Gruppen zu 50 Stück nach den Anweisungen von TOLLE und Mitarbeitern präpariert und elektronisch gezählt wurden. Parallel zu diesen 50 Proben wurden jeweils 50 Proben der gleichen Milch angesetzt, dabei jedoch zum Teil die Präparationstechnik, zum Teil das Zählverfahren geändert. Die Menge von je 100 Proben pro Ansatz erschien angebracht, weil eine Person in der Lage ist, diese in einem bestimmten Zeitraum anzusetzen und auch zu zählen. Bei einer größeren Anzahl von Proben wäre der zeitliche Abstand der ersten von den letzten Proben sowohl bei der Vorbereitung als auch

bei der Zählung wahrscheinlich zu groß geworden. Bei einigen Ansätzen wurden mehrere Versuchsanordnungen durchgeführt. Die Änderungen erfolgten nach drei großen Gesichtspunkten:

1. Die Proben wurden nach verschiedenen Zeiten der Fixierung gezählt.
2. Es wurden äußere Einflüsse als mögliche Fehlerquellen in Betracht gezogen.
3. Es wurden Reagenzien und verwendetes Instrumentarium verändert.

Man kann zwar nicht alle ausgeführten Veränderungen in diese drei Gruppen einreihen, sie wurden aber trotzdem als grobes Arbeitsschema aufrecht erhalten.

Mit den oben erwähnten 500 Proben und weiteren 800 Proben, die anders präpariert wurden und im nächsten Abschnitt im einzelnen besprochen werden, wurden insgesamt 1 300 Proben verarbeitet, elektronisch gezählt und mit den mikroskopisch erhaltenen Ergebnissen nach PRESCOTT und BREED verglichen. Dabei wurde die Aussage von LEIDL, SCHALM und LÜPS (1961) als richtig unterstellt, "wonach die Genauigkeit der Zellzahlbestimmung in geringem, die Differenzierung und damit die Zählung der polymorphkernigen Leukozyten in vermehrtem Maße, von der Erfahrung des Untersuchers abhängig ist und die Fehlergrenze der Zellzahlbestimmung nach PRESCOTT und BREED mit steigendem Zellgehalt zunimmt, die Verwendung dieser Methode für Vergleichsuntersuchungen und zur Beurteilung der Milch jedoch erlaubt sei".

Alle Zählungen wurden nach Dienstschluß in der Klinik durchgeführt. Dadurch sollten eventuelle Zählfehler durch Stromschwankungen oder Störungen infolge des Betriebes anderer elektrischer Geräte ausgeschaltet werden.

Ausgewertet und verglichen wurde die elektronische Zellzählung mit der mikroskopischen Zählung mittels der t-Verteilung nach Student. Da mehrere Autoren die beiden Zählmethoden mittels des Korrelationskoeffizienten verglichen, wurde bei den vorliegenden Untersuchungen auch dieser ermittelt und bei den Ergebnissen mitaufgeführt.

b) Ergebnisse

Zur Untersuchung der Genauigkeit des hier verwendeten COULTER-COUNTER-Gerätes wurden insgesamt 500 Milchproben aus verschiedenen Beständen nach TOLLE und Mitarbeitern elektronisch gezählt und die Ergebnisse mit der mikroskopischen Zellzählung nach PRESCOTT und BREED verglichen. Dabei ergab sich, daß die Abweichungen zum Teil mehrere Hunderttausend, in einigen Fällen sogar mehrere Millionen betrugen. Es konnte nicht festgestellt werden, daß entweder die eine oder die andere Zählmethode ständig die höheren oder niedrigeren Werte erbrachte, sondern vielmehr, daß die Schwankungen nach oben und unten in unregelmäßiger Folge auftraten. Es ergaben sich jedoch auch annähernde Übereinstimmungen. Bei überschlagsmäßigem Vergleich der Ergebnisse beider Zählmethoden war schon im voraus abzusehen, daß die Übereinstimmung sicher nicht in dem Rahmen liegt, der eine routinemäßige elektronische Zählung zuließe. Zur genauen statistischen Auswertung wurden die Untersuchungsergebnisse, wie auch bei anderen Autoren, zweckmäßigerweise in drei Gruppen innerhalb der 500 Proben aufgeteilt. Es handelt sich dabei um Proben mit einem durchschnittlichen Zellgehalt von 0 - 500 000, von 500 001 - 1 000 000 und über 1 000 000. Die weitaus meisten Ergebnisse lagen in der ersten Gruppe von 0 - 500 000, nämlich 330 Proben. Auf die zweite Gruppe entfielen 72, auf die dritte Gruppe 97 Proben. Eine Probe ging bei der Vorbereitung verloren.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse mittels der t-Verteilung errechnete sich für die Gruppe 1 ein t-Wert von 17,02, für die Gruppe 2 ein t-Wert von 12,98 und für die Gruppe 3 ein t-Wert von 8,37.

Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % müßten die t-Werte bei entsprechenden Freiheitsgraden jedoch 2,58 bzw. 2,62 und nochmals 2,62 liegen. Mithin sind bei diesem Vergleich die Unterschiede der Ergebnisse zwischen elektronischer und mikroskopischer Untersuchung signifikant, so daß eine Verwendung dieser Ergebnisse für Routineuntersuchungen nicht geeignet ist.

Wie vorher erwähnt, wurden auch die Korrelationskoeffizienten errechnet. Diese Werte lagen jedoch bei r = - 0,09 und haben somit keine Aussagekraft.

In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der 500 Proben und ihre Aufgliederung in die drei Gruppen nochmals dargestellt.

Tabelle 2

	s	d	n	r
0-500 000	162,54	152,37	330	ohne Aussage
500 001-1 000 000	243,69	372,83	72	ohne Aussage
über 1 000 000	2.638,47	2.244,29	97	ohne Aussage

Die größten Unterschiede traten in der vorliegenden Untersuchung in der Gruppe 1 bei Milchzellgehalten von 0 - 500 000 Zellen auf.

Die weiteren nun folgenden 800 Milchproben, bei denen die Versuchsbedingungen geändert wurden, wurden wiederum in Durchgängen zu je 50 vorbereitet und gezählt. Für die statistische Auswertung waren nur die Zählergebnisse geeignet, die in dem Bereich von 0 bis 500 000 lagen, da sie wiederum den zahlenmäßig größten Anteil aufwiesen, nämlich ca. 30 Ergebnisse von 50. Die übrigen Ergebnisse von 500 001 bis 1 000 000 und über 1 000 000 lagen in zu geringer Anzahl vor, als daß man sie statistisch verwerten hätte können. In der beigefügten Tabelle können jedoch alle Werte abgelesen werden.

In einem ersten Arbeitsgang (Tabelle 3) wurden parallel je 50 Milchproben angesetzt. Dabei wurden dieselben Instrumente, dieselben Reagenzien und dieselben Geräte benutzt. Es wurden 30 Ergebnisse, die zwischen 0 und 500 000 lagen, in die Auswertung genommen und es ergab sich beim Vergleich der elektronisch ermittelten Ergebnisse untereinander ein t-Wert von 4,42. Dieser müßte bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und den Freiheitsgraden von 28 (n - 2) bei 2,76 liegen. Es zeigte sich also auch hier eine signifikante Abweichung. Der Korrelationskoeffizient betrug r = + 0,60.

Beim Vergleich dieser Ergebnisse mit der mikroskopischen Zählung ergab sich ein t-Wert von 7,33 (2,76) und r = + 0,78. In Klammern sind im folgenden die in der Tabelle der t-Verteilung geforderten Werte angegeben.

Bei den nächsten Versuchen wurde die Zählung nach verschiedenen Zeiten der Fixierung und Lagerung durchgeführt.

1. Die Zählung erfolgte nach einer Fixierung von 20 Stunden bei Zimmertemperatur (Tabelle 4). Der Vergleich der Kontrollreihe, die nach der Anleitung von TOLLE präpariert wurde, und der Versuchsreihe ergab einen

   t-Wert von 6,55 (2,76).

Mit der mikroskopischen Zählung verglichen betrugen die Werte: $t = 6,71$ (2,76) und $r = + 0,76$.

Beim Vergleich der beiden elektronischen Zellzählungen untereinander wurden keine Korrelationskoeffizienten errechnet.

2. Die Zählung erfolgte nach einer Fixierung der Proben von 22 Stunden bei Zimmertemperatur (Tabelle 5). Die Ergebnisse der Kontrollgruppe wurden wiederum mit denen der Versuchsgruppe verglichen und es ergaben sich dabei folgende Werte: $t = 8,70$ (2,76).

   Desweiteren wurde die Versuchsgruppe mit der mikroskopischen Zählung verglichen und man erhielt:
   $t = 7,97$ (2,76) und $r = + 0,71$.

3. Die Proben wurden nach 48 Stunden Fixierung bei Zimmertemperatur gezählt (Tabelle 6). Ergebnisse: Vergleich der elektronischen Zählungen untereinander
   $t = 5,92$ (2,76).

   Vergleich elektronischer Zählung mit mikroskopischer Zählung: $t = 4,12$ (2,76) und $r = + 0,52$.

4. Die Proben wurden nach insgesamt 48 Stunden Fixierungsdauer gezählt. Davon wurden sie 24 Stunden bei Zimmertemperatur und 24 Stunden im Kühlraum aufbewahrt (Tabelle 7). Die ermittelten Ergebnisse erbrachten:

   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: $t = 5,70$ (2,76)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: $t = 8,12$ (2,76) und $r = + 0,74$

5. Eine weitere Zählung erfolgte nach 72 Stunden bei Aufbewahrung der fixierten Proben bei Zimmertemperatur (Tabelle 8). Dabei erhielt man folgende Ergebnisse:

   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 7,31 (2,76)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 8,02 (2,76) und r = + 0,61

6. Die fixierten Proben wurden nach 72 Stunden gezählt. Sie wurden dabei 24 Stunden bei Zimmertemperatur und 48 Stunden im Kühlraum aufbewahrt (Tabelle 9).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 7,43 (2,76)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 9,34 (2,76) und r = + 0,49

7. In einem neuen Ansatz von 50 Milchproben wurden die fixierten Proben über 24 Stunden hinweg alle 4 Stunden kräftig durchgeschüttelt und danach gezählt. Nach 6 Tagen Aufbewahrung im Kühlraum wurden nochmals elektronisch die Zellwerte ermittelt (Tabelle 10).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,25 (2,70)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 7,16 (2,70) und r = ohne Aussage

8. In der letzten Anordnung dieser Serie erfolgte die Auszählung, nachdem die Versuchsproben 1/2 Stunde im Wasserbad bei 80° C inkubiert wurden (Tabelle 11).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,16 (2,79)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 6,88 (2,79) und r = + 0,69

In der nächsten Gruppe wurden verschiedene äußere Einflüsse als mögliche Quellen für ungenaue Ergebnisse in Betracht gezogen.

1. Die Proben wurden direkt nach der Entnahme in vorbereiteten Proberöhrchen im Stall mit Formalin fixiert (Tabelle 12). Die Proberöhrchen waren dabei mit Aluminiumfolie verschlossen. Diese wurde mit der vorher sterilisierten Pipette durchstoßen und das Röhrchen anschließend mit einem Siliconstopfen verschlossen. In diesem Bestand wiesen von 50 Milchproben 43 eine Zellzahl zwischen 0 und 500 000 auf (Tabelle 12).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 3,90 (2,70)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 5,09 (2,70) und r = ohne Aussage

2. Im nächsten Fall wurden 50 Proben elektronisch gezählt, während im Hause noch mehrere andere elektrische Geräte (Zentrifuge, Wasserbad, Sterilisator, Rechenmaschine usw.) in Betrieb waren. Die Kontrollproben wurden nach Dienstschluß gezählt (Tabelle 13).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,63 (2,75)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 5,92 (2,73) und r = ohne Aussage

3. Sämtliche Reagenzien wurden vor der Verarbeitung partikelfrei filtriert. Desweiteren erfolgte kurz vor der Verdünnung der Proben mit dem Elektrolyt-Emulgator-Gemisch eine doppelte zusätzliche Filtrierung desselben (Tabelle 14).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 6,89 (2,76)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 7,57 (2,76) und r = + 0,13

4. Von denselben 50 Proben wurde zunächst jede zweimal und dann fünfmal elektronisch gezählt (Tabelle 15).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 6,12 (2,76)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 8,35 (2,76) und r = + 0,01

In der letzten der drei Versuchsanordnungen wurden die verwendeten Reagenzien und Instrumente verändert bzw. erneuert.

1. Es wurden Formalin, Milch und Elektrolyt-Emulgator-Gemisch nicht mit automatischen Dosierspritzen, sondern einzeln mit vorher gewaschenen und sterilisierten Meßpipetten abpipettiert (Tabelle 16).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,45 (2,70)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 5,36 (2,70) und r = + 0,27

2. Es wurden weiterhin vollkommen neue Reagenzien gekauft und angesetzt. Es handelte sich dabei um neues Formalin, NaCl-Tabletten, Alkohol, Triton X 100 und neue Trispufferlösung (Tabelle 17).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,00 (2,82)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 6,39 (2,82) und r = + 0,69

3. Im letzten Versuch schließlich wurde für jede zu zählende Probe ein neuer Meßbecher verwendet. Dabei kam es häufig zur Verschmutzung der Kapillaröffnung und das ganze System mußte oft durchgespült werden (Tabelle 18).
   Ergebnisse:
   elektr.Zählg.:elektr.Zählg.: t = 5,35 (2,70)
   elektr.Zählg.:mikros.Zählg.: t = 9,36 (2,70) und r = + 0,32

D DISKUSSION

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollten feststellen, inwieweit das hier verwendete Gerät COULTER-COUNTER "Modell F" für Routineuntersuchungen zur Beurteilung des Zellgehalts der Milch herangezogen werden kann. Die elektronisch ermittelten Werte wurden mit den nach PRESCOTT und BREED (1910) mikroskopisch erhaltenen Werten verglichen. Dieser Vergleich ist nach Meinung aller Autoren, die sich mit der elektronischen Zellzählung der Milch befassen, zulässig. Eine Ausnahme macht lediglich HAUKE (1968), der der Ansicht ist, daß das von PRESCOTT und BREED beschriebene mikroskopische Zählverfahren mit zahlreichen Fehlern behaftet sei, die es zu einem wenig geeigneten Maßstab für die Genauigkeit anderer Zählverfahren machten.

500 Milchproben wurden nach den Anleitungen von TOLLE und Mitarbeitern vorbereitet und präpariert. Für alle Arbeitsvorgänge wurde relativ viel Zeit aufgewendet, um eine möglichst große Genauigkeit bei den Untersuchungen zu erreichen. Diese Zeit steht bei Routineuntersuchungen sicher nicht zur Verfügung, wodurch möglicherweise die Fehlerquellen erhöht werden. Im übrigen liegt es im Sinne derartiger Routineuntersuchungen, daß möglichst schnell ein verwertbares Ergebnis vorliegt.

Die Ergebnisse wurden in drei Gruppen eingeteilt, und zwar in solche von 0 bis 500 000, von 500 001 bis 1 000 000 und über 1 000 000 Zellen. Bei den vorliegenden Werten konnte festgestellt werden, daß die elektronisch erhaltenen Zellzahlen im Vergleich zu den mikroskopisch gewonnenen die gewählten Grenzbereiche von 500 000 bzw. 1 000 000 Zellen pro ml Milch zum Teil deutlich überschreiten, zum anderen Teil aber ebenso deutlich unter diesen Grenzen liegen. Dies bedeutet einen erheblichen Nachteil, da gerade der Grenzwert

von 500 000 Zellen pro ml ein Gütemerkmal der Milch im Hinblick auf ihre Verwendung und eventuell weitere Verarbeitung darstellt. Auch wichen die Werte nicht einheitlich in ihrer Höhe nach oben oder unten ab, woraus auf einen Fehler in der Methodik zu schließen wäre, man kann vielmehr die Abweichungen nicht in genaue Grenzen einordnen.

Die statistische Auswertung erfolgte nach der t-Verteilung. Dieser Wert betrug für die 330 Ergebnisse von 0 bis 500 000 Zellen t = 17,02. Die mittlere Standardabweichung betrug 162 540 Zellen, die durchschnittliche Differenz 152 370 Zellen. Nimmt man eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 %, so müßte der t-Wert bei 328 (n - 2) Freiheitsgraden t = 2,58 betragen. Die Unterschiede der Ergebnisse aus der elektronischen und der mikroskopischen Zählmethode sind nach dieser Auswertung mithin signifikant.

Desweiteren wurde der Korrelationskoeffizient zwischen den beiden Zählmethoden errechnet. Dieser Wert wird von TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN mit r = + 0,97 angegeben, KLEINSCHROTH ermittelte ebenfalls einen Wert von r = + 0,97. Ähnliche Werte konnten bei den vorliegenden Untersuchungen nicht annähernd erreicht werden, es ergab sich vielmehr ein Korrelationskoeffizient von r = - 0,09, ein Wert also, der keine Aussage mehr zuläßt.

Ähnlich große Unterschiede wies auch die nächste Ergebnisgruppe zwischen den Grenzwerten 500 001 und 1 000 000 auf. Der t-Wert lag zwar etwas niedriger, was wohl mit der geringeren Anzahl der erhaltenen Werte (n = 72) zusammenhängt, war jedoch nichts desto weniger signifikant unterschiedlich. Der Wert betrug t = 12,98. Wiederum bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und 70 Freiheitsgraden dürfte der Wert nur bei t = 2,66 liegen. Der errechnete Korrelationskoeffizient, der von TOLLE mit r = + 0,97 angegeben wird,

hatte in diesen Fällen wiederum keine Aussagekraft. Er lag in ähnlichen Bereichen wie vorher erwähnt. Die mittlere Standardabweichung der Differenz betrug 243 690 Zellen, die durchschnittliche Differenz 372 830 Zellen.

Als letztes seien die Ergebnisse der Gruppe über 1 000 000 Zellen genannt. Auch hier das gleiche Bild wie im Vorangegangenen. Bei 97 erhaltenen Werten betrug t = 8,37. Dieser Wert sollte jedoch bei 95 Freiheitsgraden t = 2,62 betragen. Der Korrelationskoeffizient, der von TOLLE mit r = + 0,99 angegeben wird, lag in diesen Fällen wiederum bei r = - 0,09. Die mittlere Standardabweichung der Differenz betrug 2 638 970 Zellen und die durchschnittliche Differenz 2 244 290 Zellen.

Wie man aus den vorhandenen Ergebnissen ersehen kann, zeigte der t-Wert erheblich signifikante Unterschiede im Vergleich der beiden Zählmethoden. Der Korrelationskoeffizient erbrachte auch nicht im entferntesten einen Wert, der eine gute Übereinstimmung der beiden Methoden erkennen ließe, wie dies bei den Untersuchungen von TOLLE und Mitarbeitern und KLEINSCHROTH der Fall ist.

Die zum Teil erheblichen Abweichungen sind wahrscheinlich nicht auf Fehler in der Präparation, sondern vielmehr auf unbekannte Gerätefehler zurückzuführen. Dies zeigt neben der Tatsache, daß die Differenzen wechselweise nach oben und unten auftraten, auch das Ergebnis des Arbeitsganges, in dem dieselben 50 Milchproben zur selben Zeit, mit denselben Instrumenten und Geräten fixiert und nach 24 Stunden weiter verarbeitet wurden. Ausgewertet wurden hierbei nur die Werte von 0 bis 500 000 Partikeln, da die darüberliegenden Werte in zu geringer Zahl vorlagen, um eine statistische Aussage machen zu können. Bei der Auswertung ergab sich ein t-Wert von 4,42. Nach der Tabelle müßte dieser Wert wiederum bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1 % und 28 Freiheitsgraden t = 2,76 betragen. Der Korrelationskoeffizient errechnet sich

mit r = + 0,60. Die Unterschiede zur mikroskopischen Zählung waren, wie aus der Tabelle ersichtlich, ebenfalls erheblich. Diese, beim Vergleich zweier vollkommen parallel angesetzter Probeserien erhaltenen Unterschiede, sind zu groß, um eine Verwendung dieses Gerätes COULTER-COUNTER "Modell F" zuzulassen.

In den Versuchsanordnungen, bei denen die Voraussetzungen zur Zählung geändert wurden, sollte untersucht werden, ob diese Änderungen eine größere Übereinstimmung mit der mikroskopischen Zellzählung ergeben könnten. Dies war jedoch in keiner der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Versuchsgruppen der Fall. Alle Werte zeigten signifikante Unterschiede.

Die größte Annäherung der erhaltenen Werte an die geforderten erbrachten die Proben, die nach 48 Stunden Fixierung bei Zimmertemperatur gezählt wurden, mit t = 4,12 bei gefordertem t von 2,76, ferner jene Proben, die direkt nach der Entnahme im Stall fixiert wurden, nämlich t = 5,09 bei gefordertem t von 2,70. Die Signifikanz der Unterschiede ist jedoch deutlich.

Aber auch die größten Abweichungen von den geforderten Werten sollen hier erwähnt werden. Diese traten besonders in zwei Fällen auf. Zum einen war dies dann der Fall, wenn Proben gezählt wurden, die nach der Fixation 6 Tage im Kühlraum aufbewahrt wurden. Im Vergleich betrug der t-Wert 7,16 bei gefordertem t von 2,70. Der Korrelationskoeffizient hatte keine Aussage.

Im zweiten Falle kam es zu großen Abweichungen, als die Proben während des Betriebes mehrerer elektrischer Geräte im Hause gezählt wurden. Beim Vergleich der elektronischen mit der mikroskopischen Zählung errechnet sich der t-Wert mit 5,92 bei erforderlichem t von 2,75. Der Korrelationskoeffizient hatte wie im vorhergehenden Fall keine Aussage.

Im übrigen scheint aber auch noch die Ermittlung des Schwellenwertes ein Problem darzustellen, da es in den Anleitungen heißt, es sollten dazu Milchen mit hohem Zellgehalt verwendet werden. Diese Angabe ist relativ ungenau und sehr subjektiv zu beantworten. Auch TERPLAN und SCHLEYERBACH schreiben bereits 1967, daß das Aufsuchen des Zellplateaus nicht an allen Milchproben möglich ist. Es bestehen von Probe zu Probe Unterschiede in der Größenverteilung der Partikel. Es können deutliche Abgrenzungen, aber auch fließende Übergänge zwischen dem Größenbereich der Leukozyten und denjenigen anderer Teilchen - wie koagulierte Eiweißteilchen, Bakterienkolonien, nicht aufgelöste Fettkügelchen und Zelltrümmer - vorliegen.

Diese Tatsache kann man am mikroskopischen Bild eines Milchausstrichpräparates erkennen und es scheint bei der unterschiedlichen Größe der Milchzellen recht schwierig, ein Zellplateau zu finden, daß sich als repräsentativ für sämtliche elektronische Zählungen erweist.

Nach den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich keine ausreichende Übereinstimmung der Ergebnisse der Zellzahlbestimmungen nach der elektronischen und der mikroskopischen Methode. Unter der Voraussetzung, daß die mikroskopische Zellzählung nach PRESCOTT und BREED als ausreichend zuverlässiger Vergleichsmaßstab anerkannt wird, müssen die mit dem hier zur Verfügung stehenden Gerät erhaltenen Ergebnisse der elektronischen Zellzählung als zu unsicher abgelehnt werden.

Die Gründe für diese im Gegensatz zu allen bisher veröffentlichten Untersuchungsergebnissen anderer Autoren stehende Erfahrung blieben unbekannt. Fehler in der Präparationstechnik der Milchproben oder in der Bedienung des Gerätes dürften mit großer Wahrscheinlichkeit ausscheiden, da die diesbezüglich experimentell vorgenommenen Veränderungen zwar Abweichungen, jedoch keine entscheidenden Differenzen der Ergebnisse

erbrachten. Umgekehrt aber ergaben sich bei völlig parallel vorbereiteten und gezählten Proben signifikante Unterschiede der elektronischen Zählergebnisse. Dies könnte darauf hinweisen, daß die Störursache in dem hier verwendeten Gerät selbst liegt.

Die Anregung von KLEINSCHROTH, daß ein gemeinsamer Gerätekontrolldienst dafür Sorge tragen sollte, daß alle Geräte bei gleicher Einstellung vergleichbare Resultate liefern, gewinnt damit an Bedeutung. Nach der hier vorliegenden Erfahrung muß davor gewarnt werden, elektronische Zählgeräte ohne ausreichende Überprüfung für Routineuntersuchungen in der Qualitätsbeurteilung der Milch einzusetzen.

E ZUSAMMENFASSUNG

Mit dem COULTER COUNTER "Modell F" wurden an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München 500 Milchproben nach der von TOLLE, ZEIDLER und HEESCHEN entwickelten Methode elektronisch gezählt. Die Proben stammten aus verschiedenen Großbetrieben. Zum größten Teil waren es Einzelgemelke, in wenigen Fällen Viertelgemelke.

Die elektronisch ermittelten Werte wurden mit den Ergebnissen der Zellzählung nach PRESCOTT und BREED verglichen.

Dazu wurden zunächst die ermittelten Werte mit Hilfe der t-Verteilung verglichen. Dabei ergaben sich Werte, die signifikante Unterschiede aufzeigten.

Desweiteren wurde der Korrelationskoeffizient ermittelt, der im Gegensatz zu den anderen Autoren bei $r = - 0{,}09$ lag und somit verdeutlichte, daß die Werte erheblich voneinander abwichen.

Außer diesen 500 Proben wurden bei jeweils 50 Proben die Versuchsanordnungen geändert. Die so erhaltenen Werte wurden wiederum mit den mikroskopischen Zählergebnissen verglichen. Die Korrelationskoeffizienten lagen zum Teil bei $r = + 0{,}70$, die t-Werte zeigten signifikante Unterschiede.

In einem Fall wurden je 50 Milchproben parallel in zwei Ansätzen vorbereitet und ausgezählt. Beim Vergleich der elektronisch ermittelten Werte der beiden Gruppen traten wiederum erhebliche Unterschiede auf.

Aus den Ergebnissen von insgesamt 1 300 gezählten Proben kann entnommen werden, daß das Gerät, mit dem diese Zählungen durchgeführt wurden, zur Zeit für Routineuntersuchungen nicht verwendet werden kann.

F SUMMARY

At the "Gynäkologische and Ambulatorische Tierklinik München" 500 samples of milk were counted by means of the electronic COULTER COUNTER "Modell F". This method was described by TOLLE, ZEIDLER and HEESCHEN. The samples were taken from several big farms. The most of them were total milk samples, some of them were quarter milk samples.

The electronic determined results were compared with those found by the PRESCOTT and BREED method of cell count.

The statistical comparison was made by means of the t-test. The results showed significant differences. Further more the correlation of r = - 0,09 was found, which also showed a great difference to the datas in the literature.

In addition to these 500 samples, 800 other samples were counted, in the course of which the arrangements of the experiments were modified. The results were compared again with the PRESCOTT and BREED method by means of the t-test and the correlation. Both values were significantly different.

In one case 50 samples were compared in parallel arrangements. The comparison of the electronic determined results showed a great difference.

From the results of 1 300 counted samples one could arrive the conclusion that the COULTER COUNTER by the aid of which these counts were made is not suitable for routine tests at present.

G LITERATURVERZEICHNIS

(1) COULTER ELECTRONICS LTD.
"Coulter Counter" - ein Gerät zur Zählung und Bestimmung der Größenverteilung dispergierter Teilchen
Milchwiss. 19, 551-552 (1964)

(2) CULLEN G.A.
A Method of Counting Cells in Milk using an Electronic Cell Counter
Vet.Rec. 80, 188-195 (1967)

(3) DIJKMAN A.J.
Het elektronisch tellen van cellen in melk - veeteelt - en Zuivelberichten 11, 85-90 (1968)

(4) DIJKMAN A.J., SCHIPPER C.J. und WALSTRA P.:
zitiert nach TOLLE (12)

(5) HAUKE H.
Die Bestimmung des Zellgehalts der Milch mit Hilfe des elektronischen Teilchenzählgerätes TuR ZG 1
Mh.Vet.med. 24, 102-107 (1969)

(6) KLEIN H. und THOMAS H.J.
Zur Frage der Qualitätseinstufung der Anlieferungsmilch mittels der elektronischen Zellzählung
Milchwiss. 23, 153-158 (1968)

(7) KLEINSCHROTH E., RICHTER O. und SCHUMANN H.
Die Anwendung der elektronischen Bestimmung des Milchzellgehaltes im Eutergesundheitsdienst und bei der Qualitätsüberwachung der Milch
Milchwiss. 23, 147-153 (1968)

(8) LEIDL W., SCHALM O.W. und LÜPS P.
Die Zellzahlbestimmung in der Milch nach Prescott und Breed und ihre Fehlerquellen
Milchwiss. 16, 557-565 (1961)

(9) PHIPPS L.W. und NEWBOULD F.H.S.:
zitiert nach TOLLE (12)

(10) PRESCOTT S.C. und BREED B.S.:
zitiert nach LEIDL W., SCHALM O.W. und LÜPS P. (8)

(11) TERPLAN G. und SCHLEYERBACH R.
Untersuchungen zu elektronischer Zellzahlbestimmung, Brabanter Mastitis-Reaktion, Whiteside-Mastitis-Test und Labgerinnungszeit der Milch
Archiv für Lebensmittelhygiene 18, 195-201 (1967)

(12) TOLLE A., ZEIDLER H., HEESCHEN W., KRAACK J. und REICHMUTH J.
Untersuchungen über somatische Zellen, saprophytäre Keime und antibiotisch wirksame Hemmstoffe in der Rohmilch aus 12 Einzugsgebieten der BRD
Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte 20, 343-394 (1968)

(13) TOLLE A., ZEIDLER H. und HEESCHEN W.
Ein Verfahren zur elektronischen Zählung von Milchzellen
Milchwiss. 21, 93-98 (1966)

(14) TOLLE A.
Grundlagen für eine systematische Mastitis-Bekämpfung
Teil I: Ätiologie, Bedeutung und Diagnostik
Aus dem Institut für Milchhygiene der Bundesanstalt für Milchforschung in Kiel (1971)

H TABELLENANHANG

Tabelle 3

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	755	720	737	963	932	947	2.475
2	358	324	341	349	425	412	450
3	104	73	88	79	97	88	-
4	385	344	364	407	383	395	450
5	46	50	48	60	71	65	-
6	77	64	70	480	331	405	225
7	504	432	468	518	540	529	1.125
8	227	230	228	250	225	237	75
9	609	617	613	674	601	637	375
10	872	785	828	914	861	887	1.500
11	192	152	172	583	453	518	300
12	66	51	58	374	258	316	-
13	118	104	111	156	182	169	-
14	165	155	160	116	147	131	75
15	110	116	113	98	120	109	75
16	123	132	127	156	120	138	150
17	188	182	185	235	206	220	-
18	153	139	146	121	202	161	150
19	161	172	166	203	229	216	675
20	123	120	121	125	125	125	150
21	96	121	108	131	95	113	-
22	120	134	127	212	131	171	75
23	304	310	307	356	305	280	1.200
24	150	126	138	402	326	364	150

25	107	93	100	224	166	195	75
26	60	76	68	109	120	114	75
27	1.126	1.396	1.261	908	939	923	2.100
28	2.179	1.987	2.083	2.078	2.134	2.106	4.775
29	343	337	340	263	253	258	750
30	630	632	631	609	563	586	675
31	3.412	3.036	3.224	3.116	3.068	3.092	8.025
32	1.031	831	931	473	436	454	225
33	151	119	135	111	88	99	-
34	924	878	901	740	732	736	1.200
35	326	350	338	252	240	246	150
36	218	229	221	147	153	150	150
37	513	485	499	371	388	379	600
38	1.120	1.129	1.124	1.237	1.117	1.177	1.575
39	496	343	419	252	219	235	150
40	470	326	398	115	84	99	75
41	946	831	888	651	619	635	1.200
42	1.510	1.544	1.527	1.669	1.615	1.642	10.500
43	634	666	650	539	551	545	1.200
44	2.634	2.607	2.620	2.998	2.898	2.948	11.625
45	661	614	637	519	500	509	375
46	1.420	1.365	1.392	724	671	697	900
47	5.082	5.042	5.062	5.309	5.222	5.265	12.000
48	259	239	249	338	294	316	375
49	791	758	774	659	602	630	750
50	209	199	204	121	108	114	-

Tabelle 4

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	200	219	209	175
2	171	183	177	131	105	118	-
3	155	129	142	191	160	175	200
4	123	112	118	223	201	212	-
5	594	535	565	604	631	617	1.325
6	128	191	160	209	189	199	25
7	718	719	719	1.092	1.116	1.104	1.875
8	296	261	279	353	335	344	675
9	266	248	257	356	345	350	175
10	98	90	94	182	175	178	-
11	321	326	324	333	374	353	75
12	126	103	115	126	125	125	150
13	117	108	113	99	101	100	75
14	274	255	265	330	341	335	700
15	618	599	609	671	621	646	500
16	194	198	196	117	133	125	175
17	65	67	66	75	73	74	50
18	77	71	74	62	56	59	-
19	431	422	427	319	326	322	525
20	283	280	282	406	409	407	550
21	178	179	179	152	142	147	75
22	247	203	225	89	77	83	25
23	428	465	447	416	427	421	875
24	161	138	150	171	152	161	75

25	936	978	957	924	1.050	987	1.475
26	557	527	542	456	428	442	450
27	339	361	350	373	397	385	200
28	222	219	221	186	198	192	675
29	166	174	170	219	199	209	425
30	230	242	236	314	283	298	175
31	163	168	166	229	217	223	225
32	255	276	266	292	324	308	1.050
33	1.628	1.638	1.633	2.082	2.099	2.090	5.875
34	78	89	84	123	82	102	25
35	282	299	291	441	439	440	500
36	3.980	3.969	3.975	2.406	2.443	2.424	3.925
37	713	699	706	609	588	598	850
38	173	189	181	184	176	180	300
39	1.105	1.092	1.099	997	963	980	1.650
40	82	98	90	101	96	98	75
41	193	134	164	133	111	122	50
42	330	357	344	265	268	266	550
43	142	118	130	152	159	155	150
44	485	511	498	409	411	407	1.650
45	818	852	835	1.206	1.217	1.211	1.025
46	247	231	239	284	290	287	225
47	145	141	143	173	141	157	150
48	131	145	138	148	136	142	575
49	2.784	2.666	2.725	2.832	2.692	2.737	2.650
50	111	121	116	118	124	121	-

Tabelle 5

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	227	204	215	175
2	171	183	177	266	230	248	-
3	155	129	142	109	97	103	200
4	123	112	118	79	73	76	-
5	594	535	565	472	455	463	1.325
6	128	191	160	119	118	118	25
7	718	719	719	800	856	828	1.875
8	296	261	279	318	284	303	675
9	266	248	257	352	366	359	175
10	98	90	94	84	82	83	-
11	321	326	324	438	375	406	75
12	126	103	115	186	158	172	150
13	117	108	113	126	115	120	75
14	274	255	265	287	298	292	700
15	618	599	609	627	608	617	500
16	194	198	196	252	243	247	175
17	65	67	66	101	122	111	50
18	77	71	74	122	103	112	-
19	431	422	427	452	444	448	525
20	283	280	282	740	684	712	550
21	178	179	179	198	193	195	75
22	247	203	225	110	141	125	25
23	428	465	447	480	487	483	875
24	161	138	150	157	151	154	75

25	936	978	957	774	813	793	1.475
26	557	527	542	542	510	526	450
27	339	361	350	434	415	424	200
28	222	219	221	247	236	241	675
29	166	174	170	276	256	266	425
30	230	242	236	250	262	259	175
31	163	168	166	207	212	209	225
32	255	276	266	297	274	285	1.050
33	1.628	1.638	1.633	298	264	281	5.875
34	78	89	84	114	116	115	25
35	282	299	291	380	342	361	500
36	3.980	3.969	3.975	2.836	2.966	2.901	3.925
37	713	699	706	703	714	708	850
38	173	189	181	170	179	174	300
39	1.105	1.092	1.099	1.147	1.148	1.147	1.650
40	82	98	90	110	102	106	75
41	193	134	164	121	196	158	50
42	330	357	344	341	335	338	550
43	142	118	130	152	179	165	150
44	485	511	498	617	587	602	1.650
45	818	852	835	1.046	984	1.015	1.025
46	247	231	239	246	268	257	225
47	145	141	143	225	222	223	150
48	131	145	138	224	236	230	575
49	2.784	2.666	2.725	2.717	2.743	2.730	2.650
50	111	121	116	185	163	174	-

Tabelle 6

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	386	387	386	175
2	171	183	177	283	269	276	-
3	155	129	142	248	233	240	200
4	123	112	118	138	163	150	-
5	594	535	565	789	865	827	1.325
6	128	191	160	270	249	257	25
7	718	719	719	658	656	657	1.875
8	296	261	279	202	229	215	675
9	266	248	257	407	423	415	175
10	98	90	94	173	136	154	-
11	321	326	324	320	359	339	75
12	126	103	115	206	179	192	150
13	117	108	113	346	332	339	75
14	274	255	265	361	389	375	700
15	618	599	609	570	578	574	500
16	194	198	196	186	173	179	175
17	65	67	66	141	146	143	50
18	77	71	74	289	347	318	-
19	431	422	427	355	335	345	525
20	283	280	282	423	473	448	550
21	178	179	179	192	149	170	75
22	247	203	225	229	250	239	25
23	428	465	447	266	297	281	875
24	161	138	150	174	152	163	75

25	936	978	957	902	906	904	1.475
26	557	527	542	262	246	254	450
27	339	361	350	346	342	344	200
28	222	219	221	205	219	212	675
29	166	174	170	229	220	224	425
30	230	242	236	245	273	259	175
31	163	168	166	164	187	175	225
32	255	276	266	314	333	323	1.050
33	1.628	1.638	1.633	1.680	1.584	1.632	5.875
34	78	89	84	154	159	156	25
35	282	299	291	390	389	389	500
36	3.980	3.969	3.975	1.069	1.079	1.074	3.925
37	713	699	706	380	425	402	850
38	173	189	181	394	473	433	300
39	1.105	1.092	1.099	761	709	735	1.650
40	82	98	90	130	141	135	75
41	193	134	164	117	101	109	50
42	330	357	344	183	187	185	550
43	142	118	130	163	183	173	150
44	485	511	498	443	451	447	1.650
45	818	852	835	562	589	575	1.025
46	247	231	239	164	134	149	225
47	145	141	143	204	197	200	150
48	131	145	138	156	160	158	575
49	2.784	2.666	2.725	2.005	2.030	2.017	2.650
50	111	121	116	131	116	123	-

Tabelle 7

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	253	244	248	175
2	171	183	177	119	150	134	-
3	155	129	142	110	112	111	200
4	123	112	118	242	258	250	-
5	594	535	565	624	640	635	1.325
6	128	191	160	181	179	180	25
7	718	719	719	855	862	858	1.875
8	296	261	279	263	246	254	675
9	266	248	257	277	251	264	175
10	98	90	94	84	90	87	-
11	321	326	324	370	379	374	75
12	126	103	115	224	282	253	150
13	117	108	113	293	318	305	75
14	274	255	265	555	496	525	700
15	618	599	609	727	731	729	500
16	194	198	196	170	161	165	175
17	65	67	66	99	97	98	50
18	77	71	74	109	108	108	-
19	431	422	427	574	564	569	525
20	283	280	282	380	409	394	550
21	178	179	179	183	178	180	75
22	247	203	225	111	96	104	25
23	428	465	447	432	394	413	875
24	161	138	150	220	230	225	75

25	936	978	957	1.039	1.080	1.059	1.475
26	557	527	542	620	628	624	450
27	339	361	350	424	416	420	200
28	222	219	221	186	200	193	675
29	166	174	170	245	231	238	425
30	230	242	236	286	297	291	175
31	163	168	166	187	191	189	225
32	255	276	266	361	359	360	1.050
33	1.628	1.638	1.633	2.101	2.086	2.093	5.875
34	78	89	84	130	120	125	25
35	282	299	291	439	475	457	500
36	3.980	3.969	3.975	2.076	2.100	2.088	3.925
37	713	699	706	510	560	535	850
38	173	189	181	198	200	199	300
39	1.105	1.092	1.099	957	916	936	1.650
40	82	98	90	91	104	97	75
41	193	134	164	92	105	98	50
42	330	357	344	291	260	275	550
43	142	118	130	190	213	201	150
44	485	511	498	560	485	522	1.650
45	818	852	835	973	964	968	1.025
46	247	231	239	305	261	283	225
47	145	141	143	144	115	129	150
48	131	145	138	211	224	217	575
49	2.784	2.666	2.725	2.673	2.782	2.727	2.650
50	111	121	116	162	130	146	-

Tabelle 8

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	267	250	258	175
2	171	183	177	135	136	135	-
3	155	129	142	176	122	149	200
4	123	112	118	175	188	181	-
5	594	535	565	664	689	676	1.325
6	128	191	160	221	199	210	25
7	718	719	719	511	539	525	1.875
8	296	261	279	231	205	218	675
9	266	248	257	233	275	259	175
10	98	90	94	91	120	105	-
11	321	326	324	517	534	525	75
12	126	103	115	250	243	246	150
13	117	108	113	151	146	148	75
14	274	255	265	385	359	372	700
15	618	599	609	606	554	580	500
16	194	198	196	167	180	173	175
17	65	67	66	173	139	156	50
18	77	71	74	133	128	130	-
19	431	422	427	366	395	380	525
20	283	280	282	514	564	539	550
21	178	179	179	242	280	261	75
22	247	203	225	144	156	150	25
23	428	465	447	431	402	416	875
24	161	138	150	239	241	240	75

25	936	978	957	1.079	1.028	1.053	1.475
26	557	527	542	309	348	328	450
27	339	361	350	374	396	385	200
28	222	219	221	225	230	227	675
29	166	174	170	244	209	226	425
30	230	242	236	281	288	284	175
31	163	168	166	245	233	239	225
32	255	276	266	398	391	394	1.050
33	1.628	1.638	1.633	1.080	1.037	1.058	5.875
34	78	89	84	123	139	131	25
35	282	299	291	416	416	416	500
36	3.980	3.969	3.975	1.172	1.096	1.134	3.925
37	713	699	706	311	331	321	850
38	173	189	181	255	221	238	300
39	1.105	1.092	1.099	807	783	790	1.650
40	82	98	90	184	164	174	75
41	193	134	164	182	166	174	50
42	330	357	344	245	279	262	550
43	142	118	130	195	184	189	150
44	485	511	498	416	407	411	1.650
45	818	852	835	533	539	536	1.025
46	247	231	239	207	178	192	225
47	145	141	143	202	215	208	150
48	131	145	138	256	244	250	575
49	2.784	2.666	2.725	1.793	1.672	1.707	2.650
50	111	121	116	173	171	172	-

Tabelle 9

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	220	234	227	360	399	379	175
2	171	183	177	327	298	312	-
3	155	129	142	872	829	850	200
4	123	112	118	671	648	659	-
5	594	535	565	807	767	787	1.325
6	128	191	160	467	422	444	25
7	718	719	719	950	1.015	982	1.875
8	296	261	279	406	399	402	675
9	266	248	257	372	362	367	175
10	98	90	94	314	336	325	-
11	321	326	324	533	571	552	75
12	126	103	115	240	240	240	150
13	117	108	113	236	206	221	75
14	274	255	265	499	475	487	700
15	618	599	609	842	743	792	500
16	194	198	196	265	260	262	175
17	65	67	66	215	193	204	50
18	77	71	74	197	201	199	-
19	431	422	427	490	502	496	525
20	283	280	282	548	534	541	550
21	178	179	179	352	357	354	75
22	247	203	225	321	264	339	25
23	428	465	447	630	604	617	878
24	161	138	150	362	327	344	75

25	936	978	957	1.166	1.145	1.155	1.475
26	557	527	542	603	606	604	450
27	339	361	350	568	599	583	200
28	222	219	221	299	276	287	675
29	166	174	170	350	386	368	425
30	230	242	236	456	428	442	175
31	163	168	166	359	332	345	225
32	255	276	266	550	526	538	1.050
33	1.628	1.638	1.633	2.415	2.466	2.440	5.875
34	78	89	84	231	266	248	25
35	282	299	291	548	529	538	500
36	3.980	3.969	3.975	2.223	2.194	2.208	3.925
37	713	699	706	690	702	696	850
38	173	189	181	378	329	353	300
39	1.105	1.092	1.099	1.092	1.110	1.101	1.650
40	82	98	90	282	267	273	75
41	193	134	164	247	244	245	50
42	330	357	344	342	357	349	550
43	142	118	130	386	479	432	150
44	485	511	498	746	676	711	1.650
45	818	852	835	1.375	1.324	1.349	1.025
46	247	231	239	432	421	426	225
47	145	141	143	233	210	221	150
48	131	145	138	309	306	307	575
49	2.784	2.666	2.725	3.266	3.252	3.259	2.650
50	111	121	116	293	296	294	-

Tabelle 10

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	4.741	4.767	4.754	3.765	3.690	3.727	175
2	-	-	-	-	-	-	-
3	312	271	291	253	221	237	50
4	332	391	361	363	314	338	525
5	445	473	459	309	274	291	3.875
6	586	592	589	628	610	619	350
7	435	388	411	587	627	607	50
8	563	509	536	252	308	280	275
9	807	751	779	567	555	561	1.925
10	657	598	627	190	156	173	25
11	93	89	91	285	288	286	75
12	132	145	138	430	387	408	150
13	59	66	62	344	357	350	25
14	140	99	119	200	169	184	125
15	90	89	89	112	114	113	25
16	143	112	127	74	66	70	-
17	310	335	322	324	337	330	375
18	185	195	190	128	173	150	175
19	72	81	76	229	290	259	25
20	133	122	127	160	149	154	75
21	236	215	225	230	225	227	250
22	257	281	269	275	254	267	1.550
23	272	244	258	158	152	155	225
24	303	310	306	316	265	290	125

25	340	312	326	326	302	314	1.025
26	1.197	1.195	1.196	1.223	1.210	1.216	1.150
27	2.350	2.438	2.416	2.446	2.397	2.421	5.000
28	303	316	309	440	427	433	225
29	195	169	182	239	197	218	225
30	244	203	223	199	192	195	300
31	147	154	150	155	129	142	1.250
32	239	269	254	306	264	285	1.350
33	146	147	146	118	158	138	75
34	194	212	205	197	179	185	225
35	170	227	198	169	183	176	50
36	43	39	41	130	68	99	25
37	407	426	416	263	238	250	-
38	381	378	379	247	285	266	700
39	205	197	201	199	135	167	300
40	206	180	193	259	214	236	275
41	480	417	448	560	535	547	225
42	117	124	120	285	273	279	-
43	1.262	1.076	1.169	1.263	1.269	1.266	1.750
44	273	286	279	279	279	279	225
45	181	191	186	87	82	84	-
46	144	146	145	165	181	173	-
47	119	123	121	113	120	116	-
48	309	283	296	312	260	287	100
49	179	197	188	180	177	178	225
50	431	442	436	458	416	437	1.225

Tabelle 11

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	958	974	966	894	867	880	1.956
2	374	354	364	269	258	263	2.660
3	760	729	744	685	624	654	5.472
4	307	335	321	228	196	212	684
5	350	308	329	127	132	129	684
6	285	236	260	284	259	271	836
7	1.750	1.671	1.710	1.896	1.981	1.938	5.548
8	254	160	194	142	138	140	380
9	106	88	97	122	164	143	76
10	1.874	1.846	1.862	1.705	1.700	1.702	10.944
11	587	388	470	409	369	389	2.356
12	249	235	242	127	114	120	228
13	288	332	310	305	319	312	425
14	568	604	586	523	519	521	400
15	311	291	301	328	292	310	700
16	141	175	158	132	133	132	125
17	347	315	331	351	318	334	1.225
18	2.040	1.952	1.996	1.861	1.899	1.880	7.250
19	221	210	215	188	193	190	200
20	207	167	275	138	141	139	100
21	117	111	114	89	100	94	152
22	231	257	244	292	249	270	1.672
23	342	332	387	169	166	167	304
24	320	303	311	293	250	271	3.952

25	234	193	213	204	230	217	980
26	167	136	151	136	143	139	152
27	435	359	397	358	325	341	1.140
28	855	856	855	665	741	703	5.472
29	131	130	130	122	76	99	50
30	320	369	344	348	300	324	450
31	298	312	305	276	252	264	125
32	166	170	168	178	186	182	75
33	118	134	126	125	154	139	150
34	282	296	289	315	238	276	375
35	499	545	522	468	482	475	650
36	445	382	397	326	343	334	625
37	154	141	147	123	131	127	75
38	328	285	306	277	260	268	225
39	494	463	481	471	453	462	250
40	206	211	208	129	163	146	50
41	653	691	672	549	538	543	875
42	367	343	355	193	193	193	50
43	391	344	367	181	199	190	3.952
44	3.299	3.299	3.299	2.626	2.598	2.612	3.225
45	858	910	884	891	861	876	1.675
46	302	322	312	303	257	280	275
47	210	203	206	151	148	149	25
48	193	195	194	108	95	101	50
49	458	468	463	475	468	471	450
50	152	189	170	111	95	103	50

Tabelle 12

Nr.							Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	318	302	310	351	342	346	150
2	174	214	194	238	221	299	-
3	176	146	161	169	150	159	75
4	173	164	168	167	151	159	75
5	108	96	102	102	117	109	-
6	163	146	154	146	115	130	225
7	585	608	596	1.258	1.267	1.262	450
8	135	159	147	299	314	306	300
9	625	647	636	312	280	296	300
10	104	96	100	152	149	150	-
11	193	182	187	326	352	339	225
12	111	136	123	145	140	142	-
13	155	168	161	340	310	325	450
14	167	133	150	335	334	334	600
15	338	363	350	779	815	797	75
16	125	119	122	251	234	242	525
17	87	58	72	214	202	208	-
18	145	139	142	178	232	205	-
19	116	105	110	224	190	207	150
20	76	81	78	117	116	116	-
21	115	120	117	367	405	386	225
22	163	137	150	115	106	110	75
23	455	412	433	345	376	360	-
24	98	77	87	95	90	92	-

25	116	125	120	104	98	101	-
26	129	119	124	101	93	97	-
27	107	118	112	112	103	107	-
28	80	89	84	126	92	109	-
29	639	620	629	1.790	1.811	1.800	225
30	628	628	628	1.828	1.829	1.828	525
31	152	217	184	324	270	297	150
32	227	314	270	587	640	613	900
33	121	135	128	203	206	204	150
34	81	85	83	256	218	237	-
35	86	92	89	189	204	196	150
36	93	82	87	203	170	186	-
37	385	373	379	707	685	696	300
38	427	411	419	776	807	791	1.950
39	80	82	81	192	162	177	-
40	67	62	64	215	201	208	-
41	182	173	177	184	178	181	385
42	244	226	235	395	349	372	825
43	405	431	418	356	330	343	525
44	135	235	185	196	198	197	150
45	124	98	111	135	144	139	-
46	373	342	357	363	276	319	150
47	410	351	380	283	310	296	375
48	164	173	168	213	206	209	300
49	146	172	159	154	146	150	-
50	92	83	87	138	122	130	-

Tabelle 13

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	2.983	2.763	2.873	5.167	5.903	5.535	3.225
2	773	873	823	871	826	848	1.575
3	1.313	1.262	1.287	838	1.697	1.267	1.625
4	708	600	654	855	834	844	225
5	1.666	1.791	1.782	2.429	2.479	2.454	1.200
6	642	644	643	848	690	769	600
7	378	455	416	600	586	593	75
8	6.182	6.205	6.193	7.136	7.140	7.138	7.725
9	480	430	455	574	536	555	-
10	203	188	195	169	153	161	75
11	360	399	379	131	133	132	-
12	502	461	481	319	373	346	375
13	1.076	1.094	1.085	816	829	822	450
14	281	248	264	342	350	346	150
15	1.723	1.636	1.679	2.217	2.200	2.208	525
16	621	609	615	538	488	513	300
17	6.201	6.099	6.150	7.138	7.496	7.317	4.775
18	370	383	376	455	457	456	300
19	1.702	1.602	1.652	1.832	1.743	1.787	600
20	293	302	297	284	253	268	-
21	207	230	218	128	131	129	-
22	1.215	1.234	1.224	1.517	1.458	1.487	225
23	1.136	1.180	1.158	1.196	1.322	1.259	1.425
24	530	527	528	1.205	1.182	1.193	75

25	591	592	591	417	381	399	75
26	374	367	370	490	459	474	150
27	186	156	171	146	159	152	-
28	178	174	176	97	122	109	75
29	338	283	310	175	131	153	75
30	378	388	383	285	318	301	150
31	287	258	272	68	176	122	-
32	879	903	891	818	798	808	225
33	1.824	1.807	1.815	1.677	1.676	1.676	300
34	1.265	1.279	1.272	1.849	1.965	1.907	525
35	1.777	1.807	1.792	1.828	1.969	1.898	825
36	409	360	384	484	445	464	150
37	912	862	887	646	670	658	-
38	591	592	591	425	415	420	75
39	448	432	440	551	607	579	75
40	485	435	460	793	798	795	-
41	3.001	2.845	2.923	4.426	4.288	4.357	1.950
42	2.959	3.114	3.030	4.344	4.097	4.220	5.250
43	1.283	1.233	1.258	2.071	1.839	1.955	150
44	330	258	294	407	399	403	75
45	1.138	1.139	1.138	1.145	1.093	1.119	675
46	202	231	216	226	251	238	-
47	345	345	345	378	352	365	75
48	204	221	212	269	235	252	375
49	887	843	865	982	905	943	875
50	133	287	210	157	156	156	-

Tabelle 14

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	375	391	383	438	446	442	75
2	238	208	223	329	327	328	300
3	103	128	115	383	343	363	-
4	1.353	1.295	1.324	1.201	1.211	1.206	2.325
5	480	473	476	378	388	383	300
6	476	486	481	560	497	528	225
7	808	748	778	930	861	895	1.800
8	346	309	327	373	363	368	750
9	391	334	362	438	407	422	375
10	494	529	511	614	609	611	825
11	292	258	275	253	270	261	225
12	406	381	393	300	309	304	-
13	235	260	247	254	262	258	300
14	729	709	719	676	703	689	1.500
15	376	292	334	340	329	334	75
16	305	322	313	244	195	219	225
17	298	303	300	348	330	339	75
18	658	608	633	417	356	386	525
19	414	412	413	454	422	438	600
20	314	330	322	333	318	325	-
21	145	115	130	102	109	105	300
22	140	145	142	221	183	202	-
23	258	259	258	373	337	355	300
24	195	209	202	408	386	397	450

25	137	143	140	212	187	199	825
26	106	110	108	181	146	163	-
27	257	184	220	253	225	239	300
28	248	289	268	302	258	280	75
29	275	284	279	199	188	193	75
30	299	219	259	296	269	282	825
31	267	240	253	300	287	293	600
32	78	78	78	375	327	351	225
33	356	334	345	272	270	271	800
34	3.443	3.518	3.480	3.206	3.139	3.172	10.500
35	834	861	847	619	638	628	750
36	698	715	706	668	611	639	1.350
37	228	297	262	278	277	277	450
38	1.059	1.062	1.060	848	830	839	2.250
39	2.567	2.535	2.551	2.477	2.523	2.500	5.100
40	198	231	214	268	394	331	75
41	1.075	1.061	1.068	1.050	1.065	1.057	4.525
42	1.374	956	1.165	441	496	468	600
43	261	218	239	315	281	298	300
44	226	177	201	318	310	314	75
45	108	110	109	237	289	263	375
46	118	103	110	221	225	223	225
47	203	285	244	629	592	610	675
48	158	150	154	300	299	299	150
49	400	409	404	584	558	571	825
50	326	293	309	451	492	471	150

Tabelle 15

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe						Prescott und Breed
	Zählg.1	Zählg.2	Mittelwert	Zählg.1	Zählg.2	Zählg.3	Zählg.4	Zählg.5	Mittelwert	
1	375	391	383	375	391	362	378	385	378	75
2	238	208	223	238	208	219	225	237	225	300
3	103	128	115	103	128	144	182	109	133	-
4	1.353	1.295	1.324	1.353	1.295	1.291	1.263	1.235	1.287	2.325
5	480	473	476	480	473	385	445	486	453	300
6	476	486	481	476	486	536	466	437	480	225
7	808	748	778	808	748	776	778	875	797	1.800
8	346	309	327	346	309	312	332	322	324	750
9	391	334	362	391	334	342	381	327	355	375
10	494	529	511	494	529	512	494	557	517	825
11	292	258	275	292	258	276	236	260	264	225
12	406	381	393	406	381	372	365	405	385	-
13	235	260	247	235	260	239	281	284	259	300
14	729	709	719	729	709	787	763	746	746	1.500
15	376	292	334	376	292	333	344	286	326	75
16	305	322	313	305	322	300	294	295	303	225
17	298	303	300	298	303	293	338	268	300	75
18	658	608	633	658	608	657	656	715	658	525
19	414	412	413	414	412	469	1.559	1.016	774	600
20	314	330	322	314	330	314	265	338	312	-
21	145	115	130	145	115	136	132	145	134	300
22	140	145	142	140	145	131	146	100	132	-
23	258	259	258	258	259	259	261	274	264	300
24	195	209	202	195	209	156	172	153	177	450

25	137	143	140	137	143	111	98	108	119	825
26	106	110	108	106	110	98	88	99	100	-
27	257	184	220	257	184	208	252	236	227	300
28	248	289	268	248	289	258	219	275	257	75
29	275	284	279	275	284	305	272	304	289	75
30	299	219	259	299	219	222	212	220	234	825
31	267	240	253	267	240	267	284	289	269	600
32	78	78	78	78	78	87	82	79	80	225
33	356	334	345	356	334	337	352	287	333	800
34	3.443	3.518	3.480	3.443	3.518	3.435	3.408	3.568	3.474	10.500
35	834	861	847	834	861	862	794	819	834	750
36	698	715	706	698	715	665	730	689	699	1.350
37	228	297	262	228	297	322	314	321	296	450
38	1.059	1.062	1.060	1.059	1.062	979	982	1.049	1.026	2.250
39	2.567	2.535	2.551	2.567	2.535	2.569	2.586	2.571	2.565	5.100
40	198	231	214	198	231	232	204	220	217	75
41	1.075	1.061	1.068	1.075	1.061	1.114	1.082	1.140	1.094	4.525
42	1.374	956	1.165	1.374	956	564	468	429	758	600
43	261	218	239	261	218	242	241	239	240	300
44	226	177	201	226	177	145	119	175	168	75
45	108	110	109	108	110	116	99	105	107	375
46	118	103	110	118	103	106	108	105	107	225
47	203	285	244	203	285	301	279	297	273	675
48	158	150	154	158	150	151	154	141	150	150
49	400	409	404	400	409	368	346	354	375	825
50	326	293	309	326	293	282	322	344	313	150

Tabelle 16

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	276	236	256	189	131	160	150
2	348	343	345	254	264	259	375
3	471	479	475	476	455	465	225
4	109	108	108	188	217	202	-
5	150	164	157	602	549	575	750
6	205	193	199	218	208	213	-
7	318	295	306	1.095	449	772	75
8	161	179	170	171	154	162	225
9	647	534	590	522	518	520	1.200
10	152	131	141	134	83	108	225
11	345	351	348	662	738	700	675
12	352	344	348	431	450	440	-
13	463	429	446	213	197	205	75
14	795	769	782	696	776	736	750
15	357	321	339	453	465	459	375
16	246	249	247	191	203	197	150
17	1.679	1.703	1.691	1.419	1.469	1.444	5.400
18	188	183	185	395	390	392	450
19	253	289	271	98	83	90	-
20	362	352	357	326	255	290	450
21	278	289	283	280	273	276	300
22	82	82	82	92	77	84	150
23	217	229	223	274	262	268	150
24	563	547	555	356	266	311	450

25	729	714	721	645	636	640	2.175
26	46	90	68	107	94	100	75
27	290	205	247	182	173	177	75
28	235	237	236	179	192	185	75
29	161	146	153	206	178	192	150
30	1.870	1.755	1.812	1.786	1.837	1.811	2.575
31	1.346	1.494	1.420	1.275	1.311	1.293	2.900
32	169	156	162	147	203	175	75
33	622	663	642	314	328	321	550
34	510	552	531	386	474	430	525
35	603	635	619	838	929	883	225
36	457	409	433	763	459	611	175
37	129	112	120	160	120	140	-
38	101	113	107	151	133	142	75
39	204	214	209	271	227	249	375
40	211	289	250	382	322	352	225
41	127	127	127	176	139	157	225
42	111	95	103	143	124	133	-
43	190	187	188	175	124	157	225
44	124	123	123	166	139	148	-
45	94	92	93	104	130	117	300
46	521	435	478	199	223	211	150
47	131	133	132	95	91	93	-
48	693	683	688	555	539	547	2.625
49	132	115	123	128	114	121	-
50	180	220	200	176	152	164	75

Tabelle 17

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	102	102	102	87	69	78	-
2	1.412	1.481	1.446	1.614	1.671	1.650	2.150
3	97	97	97	93	92	92	300
4	511	512	511	476	523	499	1.250
5	313	281	297	347	327	337	775
6	110	117	113	189	186	187	75
7	2.337	2.328	2.332	2.073	2.042	2.057	5.100
8	722	703	712	598	630	614	2.025
9	135	134	134	83	65	74	75
10	289	263	276	165	160	162	525
11	777	807	792	1.179	1.152	1.165	1.650
12	220	168	194	347	282	314	225
13	214	194	204	265	219	242	750
14	196	162	179	433	316	360	150
15	2.719	2.626	2.672	3.168	3.283	3.225	13.875
16	198	228	213	316	330	323	225
17	2.980	2.974	2.977	3.099	3.065	3.082	9.225
18	3.424	3.373	3.398	3.650	3.597	3.623	8.475
19	384	384	384	439	397	418	375
20	4.034	3.935	3.984	3.999	4.080	4.039	7.725
21	923	898	910	935	954	944	1.225
22	90	78	84	109	108	108	150
23	156	122	139	172	165	168	-
24	896	796	846	1.009	1.022	1.015	4.575

25	477	479	478	595	543	569	600
26	241	259	247	432	415	423	900
27	81	86	83	84	133	108	-
28	385	383	384	386	333	359	1.275
29	94	89	91	91	89	90	-
30	593	544	568	1.034	989	1.011	2.100
31	347	331	339	460	423	441	675
32	175	194	184	125	125	125	-
33	574	605	589	624	589	606	1.650
34	356	344	350	443	415	429	525
35	991	981	986	1.277	1.243	1.260	1.425
36	417	380	398	510	571	540	300
37	265	286	275	291	297	294	450
38	322	276	299	323	307	315	825
39	426	384	405	230	223	226	150
40	969	911	940	1.099	1.051	1.075	1.875
41	139	130	134	115	113	114	-
42	251	278	264	247	260	253	450
43	3.295	3.188	3.241	3.234	3.232	3.233	19.175
44	167	164	165	187	180	183	-
45	181	178	179	194	187	190	300
46	418	398	408	407	388	397	575
47	146	145	145	231	218	224	225
48	732	674	703	721	727	724	4.125
49	1.306	1.256	1.281	1.493	1.369	1.406	6.150
50	229	224	226	254	263	258	225

Tabelle 18

Nr.	Kontrollgruppe			Versuchsgruppe			Prescott und Breed
	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	Zählung 1	Zählung 2	Mittelwert	
1	670	632	651	612	607	609	3.825
2	118	152	135	212	216	214	675
3	188	203	195	227	258	242	800
4	181	132	156	170	153	161	750
5	132	147	139	69	82	75	-
6	492	575	533	583	565	574	3.300
7	228	206	216	162	206	158	300
8	225	187	206	166	154	160	525
9	227	204	215	507	269	388	150
10	151	125	138	319	319	319	385
11	123	115	119	436	334	385	75
12	134	98	116	109	166	137	-
13	159	149	159	299	280	289	725
14	178	181	179	369	348	356	1.575
15	287	305	296	412	327	369	1.425
16	126	114	120	87	135	111	600
17	103	116	109	156	155	155	-
18	120	107	113	103	123	113	150
19	492	399	445	232	231	231	750
20	387	371	379	316	325	320	450
21	289	209	249	291	165	228	450
22	150	166	158	240	221	230	-
23	94	96	95	191	97	144	-
24	190	190	190	197	222	209	300

25	491	492	491	727	647	687	1.200
26	158	138	148	206	327	266	-
27	216	246	231	254	171	212	-
28	134	143	138	195	139	167	75
29	194	188	191	376	447	411	375
30	243	227	235	179	202	188	-
31	122	116	119	413	399	406	-
32	123	114	118	219	173	196	-
33	172	174	173	191	203	197	75
34	156	192	174	86	74	80	-
35	113	106	109	173	189	181	150
36	219	188	203	200	273	236	150
37	228	224	226	275	268	271	-
38	158	120	139	110	100	105	-
39	86	84	85	83	68	75	450
40	149	160	154	144	199	171	-
41	365	308	336	337	307	322	300
42	199	207	203	446	448	447	525
43	209	234	221	184	192	188	300
44	303	325	314	291	315	303	375
45	1.324	1.307	1.315	1.186	1.243	1.210	1.950
46	126	115	120	155	120	137	-
47	174	181	177	198	169	183	-
48	745	530	637	291	237	264	375
49	392	307	349	278	384	331	375
50	194	133	163	157	443	300	150

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. W a l s e r für die freundliche Überlassung des Themas.

Danken möchte ich auch Herrn Diplom-Mathematiker Dr. O s t e r k o r n vom Institut für Tierzucht, der mir bei der Lösung statistischer Fragen zur Seite stand.

Außerdem danke ich Frau L. S c h u l t z e für ihre jederzeit gewährte Unterstützung.

Lebenslauf

Am 28. Mai 1944 wurde ich, Klaus Brunold, als Sohn des Malermeisters Hans Brunold und seiner Ehefrau Charlotte, geb. Brandl, in Amberg (OPf) geboren.

Dort besuchte ich von 1950 bis 1954 die Volksschule. Im September 1954 trat ich in die Oberrealschule Amberg über und legte dort 1964 das Abitur ab.

Im Wintersemester 1964 begann ich mit dem Studium der Tiermedizin an der Universität München. Das Studium beendete ich mit dem Examen im Frühjahr 1970.

Die Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 23. April 1970.

Seit dem 1. September 1970 bin ich als Assistent an der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik München tätig.